

THESIS

MARBURG

1966

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Siebert)

**Immunelektrophoretische
Untersuchungen
über Antigengemeinschaften zwischen
Sproßpilzen verschiedener Spezies**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karin Kranenberg
aus Arnswalde

Marburg, 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Sievert)

**Immunelektrophoretische
Untersuchungen
über Antigengemeinschaften zwischen
Sproßpilzen verschiedener Spezies**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karin Kranenberg

aus Arnswalde

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg/Lahn am: 15.12.1966

Dekan : Prof. Dr.med. O.Braun-Falco
Referent : Prof. Dr.med. R.Siegert, Hygiene-Institut
der Universität Marburg/Lahn
Correferent : Prof. Dr.med. Dr.med.dent. H.Heuser

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methodik	
1. Hefestämme	2
2. Züchtung	2
3. Antigenbereitung für die Immunisierung	3
4. Gewinnung der Immunseren	3
5. Antigenbereitung für die Immunelektrophorese	3
6. Immunelektrophorese	4
C. Ergebnisse	
1. Agarelektrophorese	5
2. Immunelektrophorese mit homologen Antigenen	5
a) <i>Torulopsis glabrata</i>	
b) <i>Schistosaccharomyces octosporus</i>	
c) <i>Saccharomyces rouxii</i>	
d) <i>Cryptococcus neoformans</i>	
3. Immunelektrophorese mit heterogenen Antigenen	7
a) Immunelektrophoresen von Hefen außer <i>Candida</i>	
b) Gegenüberstellung der Immunelektrophoresen aller verwendeten Sproßpilze	
4. Versuche zur Isolierung von Eiweißantigenen	13
a) Fällung mit Ammoniumsulfat (E_1)	
b) Fällung mit Universalpuffer (E_2)	
D. Besprechung	16
E. Zusammenfassung	20
F. Literaturverzeichnis	21



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. EINLEITUNG

Serologische Untersuchungen vieler Autoren haben gezeigt, daß zahlreiche Pilzarten gemeinsame Antigene besitzen. Nach SEELIGER (1958) sind Kreuzreaktionen infolge partieller Antigengemeinschaften nicht selten, besonders zwischen phylogenetisch verwandten, aber auch zwischen heterologen Pilzen.

In neuerer Zeit versucht man, eine Neugliederung der Sproßpilze auf Grund ihrer Antigengemeinschaften vorzunehmen. So stellte TSUCHIYA (1965) bereits eine Antigentabelle zusammen. Mit der von ihm verwendeten Methode - Immunisierung mit intakten Hefezellen und Absorption ebenfalls mit intakten Hefezellen - lassen sich aber nur Zellwandantigene erfassen. BIGUET (1961) konnte erstmals mit Hilfe der Immunelektrophorese an Anti-Candida-Seren, die durch Immunisierung mit zertrümmerten Hefezellen gewonnen wurden, nachweisen, daß die Sproßpilze außer Polysaccharidantigenen auch Eiweißantigene besitzen. Untersuchungen von MÜLLER und HIRSCH (1966) an getrenntem Zellmaterial zeigen, daß im Zellinhalt Polysaccharid- bzw. Glykoprotein- und Eiweißantigene vorhanden sind, die Zellwand aber nur Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene besitzt.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die Eiweißantigene in dem Schema von TSUCHIYA (1965) aus methodischen Gründen unberücksichtigt geblieben sind.

Zur Zeit ist die Immunelektrophorese zweifellos die empfindlichste Methode, Antigengemeinschaften aufzufinden. Es soll deshalb in der vorliegenden Arbeit mit diesem Verfahren an einer willkürlichen Auswahl von Stämmen aus den Spezies *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Schicosaccharomyces*, *Cryptococcus* und *Candida* untersucht werden, ob Beziehungen zwischen den Arten auf Grund von gemeinsamen Eiweiß- oder Polysaccharidantigenen bestehen.

B. METHODIK

1. Hefestämme

Sie stammen aus dem Zentralbureau voor Schimmelculturs in Delft.

Zur Herstellung von Immunseren dienten folgende Stämme: *Torulopsis glabrata* (Tor.glab.)

Saccharomyces rouxii (Sacch.roux.)

Schicosaccharomyces octosporus (Schico.oct.)

Cryptococcus neoformans (Crypt.neof.)

Candida albicans (C.alb.)

Candida tropicalis (C.trop.)

Candida Krusei (C.Krus.)

Candida stellatoidea (C.stella.)

Zur Gewinnung von Antigenen für die Immunelektrophorese wurden zusätzlich noch folgende Stämme benutzt:

Candida utilis (C.util.)

Candida curvata (C.curv.)

Candida robusta (C.rob.)

Torulopsis famata (Tor.fam.)

Saccharomyces cereviseae (Sacch.cer.)

2. Züchtung

Die auf Sabouraud-Maltose-Agar (Difco) überimpften Stämme wurden 48 Stunden bei 30° C bebrütet. Den *Cryptococcus neoformans* Stamm inkubierten wir wegen der üppigen Schleimbildung der Kapseln dagegen nur 24 Stunden.

Nach Abschwemmen der Platten mit 0,9% NaCl-Lösung wurde die Hefesuspension im allgemeinen 10 Minuten, jene von *Cryptococcus neoformans* und *Saccharomyces rouxii* 15 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert, und das so erhaltene Sediment dreimal mit 0,9% NaCl-Lösung ausgewaschen, um Nährbodenbestandteile zu entfernen.

3. Antigenbereitung für die Immunisierung

Die Zellen der verschiedenen Stämme wurden in einer ca. 25 Vol. %igen Suspension in 0,9% NaCl-Lösung 30 Minuten mit Glaskugeln von 0,5 mm Durchmesser in der Kugelmühle (Fa. Bühler, Tübingen) bei 800 UpM zerrieben, die Zellen des *Cryptococcus neoformans* Stammes wurden 60 Minuten lang homogenisiert. Das von den Glasperlen abgehobene Material diente in entsprechender Verdünnung als Antigen.

4. Gewinnung der Immunseren

Mit den homogenisierten Suspensionen der unter 1 beschriebenen Hefen wurden jeweils zwei Kaninchen i.v. (Ohrvene) immunisiert. Sie erhielten insgesamt ca. 300 mg Trockensubstanz der Hefezellen, und zwar in folgenden Dosen: am 1. Tag wurden nach Probepunktion 0,5 ml (wobei 1 ml ca. 18 mg Trockensubstanz enthielt) der jeweiligen antigenhaltigen Suspension gespritzt. Die injizierten Mengen betrugen am 2. Tag 1 ml, am 3. Tag 1,5 ml und am 4. und 5. Tag je 2 ml. Danach erfolgten die Injektionen in 2-tägigem Abstand noch sechsmal mit je 2 ml. Am 3. Tag nach der letzten Injektion wurde Blut entnommen. Zeigte es in der Immunelektrophorese keine deutlichen Präzipitationslinien, wurde die Immunisierung mit Injektionen von 2ml-Mengen fortgesetzt, bis genügend Antikörper gebildet waren.

5. Antigenbereitung für die Immunelektrophorese

Die in aqua dest. suspendierten Hefezellen (50 Vol %) wurden 30 Minuten, wie vorher beschrieben, in der Kugelmühle zerrieben und unverdünnt als Antigen für die Immunelektrophorese verwendet.

6. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde in Anlehnung an GRABAR und WILLIAMS (1955), modifiziert nach SCHEIDEGGER (1955), in der LKB-Apparatur durchgeführt.

Als Puffer diente der von Michaelis angegebene Diaethylbarbitursäurepuffer, Ionenstärke 0,1. Er enthielt 6,4 g Natrium-Acetat und 9,81 g diaethylbarbitursaures Natrium, gelöst in 1000 ml aqua dest., und war mit 1 n HCl auf pH 8,2 eingestellt.

Für den benötigten 1,2 %igen Agar wurden 1,2 g "Difco" Agar Special-Noble in 100 ml des mit Wasser 1:2 verdünnten Puffers im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Erstarren des Agars auf den Objektträgern wurden mit einem Stempel Löcher für die Antigene und ein Graben für das Immunsérum gestanzt.

Nach einer Laufzeit von einer Stunde bei einer Spannung von 250 Volt (10 Volt/cm) waren die Antigene so weit wie möglich getrennt. Die Objektträger kamen 12-24 Stunden bis zur völligen Entwicklung der Präzipitationslinien in eine feuchte Kammer. Danach erfolgte 12-stündiges Spülen in physiologischer Kochsalzlösung, um nicht gebundene Antigen- und Serumstoffe zu entfernen. Nach Abspülen mit aqua dest. wurden die Präparate unter Fließpapier getrocknet, nochmals kurz mit Wasser angefeuchtet und mit Amidoschwarz gefärbt.

7. ERGEBNISSE

1. Agarelektrophorese

Über das Verhalten einiger Candidaarten in der Agarelektrophorese liegen bereits Untersuchungen von MÜLLER und HIRSCH (1966) vor.

Es sollte geprüft werden, ob auch das Homogenisat anderer Sproßpilze durch Elektrophorese in zwei Substanzgruppen getrennt werden kann. Dazu wurden Agarelektrophoresen von *Torulopsis glabrata*, *Torulopsis famata*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schicosaccharomyces octosporus* und *Cryptococcus neoformans* angesetzt. Es ließen sich auch bei diesen Heßen zwei unterschiedliche Stoffklassen nachweisen, eine anodenwärts wandernde - mit Amidoschwarz färbbar - und eine zur Kathode wandernde - mit p-Aminosalicylsäure darstellbar.

2. Immunelektrophoresen mit homologen Antigenen

Zur Prüfung, ob sich die in der Agarelektrophorese getrennten Substanzgruppen antigen verhalten, wurden die Immunseren gegen *Saccharomyces rouxii*, *Torulopsis glabrata*, *Schicosaccharomyces octosporus* und *Cryptococcus neoformans* mit ihren homologen Antigenen in der Immunelektrophorese zusammengebracht.

a) *Torulopsis glabrata*

Abb.1 zeigt das charakteristische Immunelektrophoresebild von *Torulopsis glabrata*

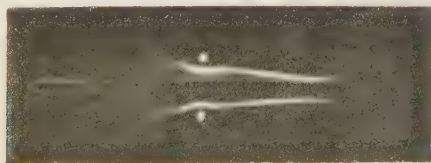


Abb.1 Anti-*Torulopsis glabrata*-Serum
mit homologem Antigen

Im Kathodenbereich präzipitiert eine starke Bande, die in drei Bögen ausläuft. Am Auftragspunkt liegt eine sehr starke Linie, und eine weitere zarte zieht sich zur Anode hin. Gelegentlich konnte man mit dem gleichen Serum sogar drei Linien im Eiweißbereich erkennen.

b) Schicosaccharomyces octosporus

Trotz der in der Agarelektrophorese anodenwärts gewanderten Fraktion ergab die Immunelektrophorese keine Präzipitationslinie im Anodenbereich. Wie auf Abb.2 zu erkennen ist, war nur eine sehr starke Bande aufgetreten, die vom Auftragspunkt bis weit in den Kathodenbereich zieht.

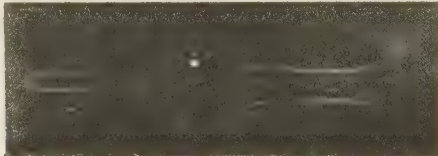


Abb.2 Anti-Schicosaccharomyces octosporus-Serum mit homologem Antigen

c) Saccharomyces rouxii

Mit dem Anti-Saccharomyces rouxii-Serum des einen Tieres ergaben sich zwei Präzipitationslinien am Auftragspunkt und eine weitere kräftige Linie im Kathodenbereich (Abb.3). Mit dem Serum des zweiten Tieres kamen eine nicht so ausgeprägte Polysaccharidlinie und eine, wenn auch sehr zarte Eiweißlinie zustande, der eine mit Amidoschwarz anfärbbare Zone im Anodenbereich bei der Agarelektrophorese entspricht.

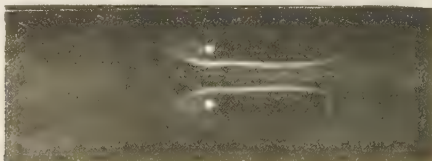


Abb.3 Anti-Saccharomyces rouxii-Serum mit homologem Antigen

d) Cryptococcus neoformans

Das entsprechende Antiserum ergab mit dem homologen Antigen keine Präzipitationslinien in der Immunelektrophorese. Trotz massiver Weiterimmunisierung mit konzentrierten Antigenmengen konnte kein nachweisbarer Antikörper erzeugt werden. BENHAM (1931), NEGRONI und SEELIGER (1958) berichten, daß eine Antikörperproduktion mit *Cryptococcus neoformans* kaum gelingt. Hierbei sollen die Beziehungen zwischen der Kapselsubstanz und den immunisierenden Fähigkeiten bestehen. Nach SEELIGER (1958) und BENHAM (1931) erfolgt eine bessere Antikörperbildung, wenn kapselschwache Stämme verimpft werden. Durch Verringerung des Kapselwachstums und längeres Homogenisieren, das - im Mikroskop deutlich sichtbar - die Zerstörung der Kapseln bewirkt, hofften wir eine bessere Immunisierung zu erzielen. Es wurde mit mindestens der doppelten Menge, wie sie zur Antikörperbildung bei anderen Hefen ausreicht, immunisiert. Da kein kapselschwacher Stamm zur Verfügung stand, mußte auf ein Anti-*Cryptococcus neoformans*-Serum verzichtet werden.

3. Immunelektrophoresen mit heterologen Antigenen

a) Immunelektrophoresen von Hefen außer Candida

Die Seren gegen *Torulopsis glabrata*, *Schizosaccharomyces octosporus* und *Saccharomyces rouxii* wurden in der Immunelektrophorese mit den zur Verfügung stehenden Hefe-Antigenen (außer *Candida*-Arten) gekreuzt, um Verwandtschaften zu erkennen. Die Ergebnisse der immunelektrophoretischen Auswertungen sind in Tab.1 zusammengefaßt.

Tab.1 Auswertung der Immunelektrophoresepräparate
der Hefen (außer Candida)

Antigen	Antiserum								
	Tor.glab.			Schico.oct.			Sacch.roux.		
	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka
Tor.glab.	++	+	+++	-	-	-	+	+	+
Tor.fam.	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Schico.oct.	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Crypt.neof.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacch.roux.	+	+	+	-	-	-	+	++	+
Sacch.cer.	-	+	+++	-	-	-	-	-	+++

An = Anode

A = Auftragspunkt

Ka = Kathode

+ = 1 Präzipitationslinie

++ = 2-3 Präzipitationslinien

+++ = 4 und mehr Linien

- = keine Präzipitationslinien

Auffällig ist die enge Antigengemeinschaft von *Torulopsis glabrata* und *Saccharomyces rouxii* (siehe Abb.4 und Abb.5). Beide haben neben jeweils einem Polysaccharid und einem am Auftragspunkt liegenden Antigen auch eine Eiweißlinie gemeinsam.

Schiosaccharomyces octosporus bildet mit Anti-*Saccharomyces-rouxii*-Serum zwei Präzipitationslinien. Umgekehrt treten bei *Saccharomyces rouxii* mit Anti-*Schiosaccharomyces-octosporus*-Serum keine Präzipitationslinien auf. Möglicherweise war dieses Serum zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht mehr optimal in seinem Antikörpergehalt. So entstanden mit dem homologen Antigen keine Linien im Anodenbereich.

Cryptococcus-neoformans-Antigen weist keine Antigengemeinschaft mit *Torulopsis glabrata*, *Schiosaccharomyces octosporus* und *Saccharomyces rouxii* auf.

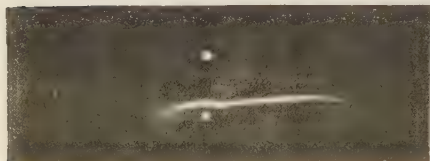


Abb.4. Anti-Tor.glab.-Serum
gegen:oben Sacch.roux.
unten Tor.glab.



Abb.5 Anti-Sacch.roux.-Serum
gegen:oben Sacch.roux.
unten Tor.glab.

b) Gegenüberstellung der Immunelektrophoresen mit
allen verwendeten Sproßpilzen

Es war ferner von Interesse, welche der Candida-Arten Antigengemeinschaften mit den vorher geprüften Hefen

besitzen. Dazu wurden mit Immunseren, die gegen sieben Hefearten gerichtet waren, mit allen zur Verfügung stehenden Hefeantigenen immunoelektrophoretisch geprüft. Die Ergebnisse der ausgewerteten Präparate, von denen die folgenden Abbildungen eine Anschauung geben, sind in Tab.2 zusammengestellt worden.



Abb.6
Anti-C.Krus.-Serum
gegen: oben C.Krus.
unten Sacch.roux.

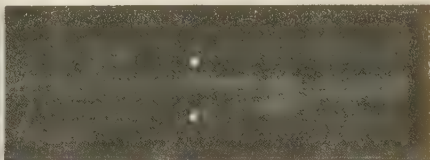


Abb.7
Anti-C.Krus.-Serum
gegen: oben C.Krus.
unten Crypt.neof.

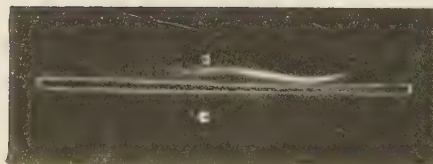


Abb.8
Anti-Tor.glab.-Serum
gegen: oben Tor.glab.
unten C.util.

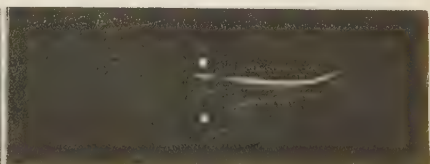


Abb.9
Anti-Tor.glab.-Serum
gegen: oben Sacch.cer.
unten Sacch.roux.

Weitere Abbildungen von Immunelektrophoresepräparaten



Abb.10
Anti-Sacch.roux.-Serum
gegen: oben Sacch.roux.
unten C.rob.

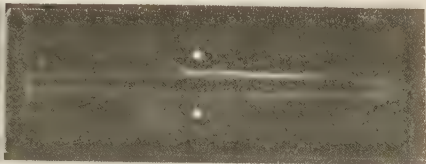


Abb.11
Anti-Sacch.roux.-Serum
gegen: oben Sacch.roux
unten Sacch.cer.



Abb.12
Anti-C.alb.-Serum(60°)
gegen: oben Schico.oct.
unten Crypt.neof.



Abb.13
Anti-C.alb.-Serum(60°)
gegen: oben Tor.glab
unten Tor.fam.



Abb.14
Anti-Tor.glab.-Serum
gegen: oben Tor.glab.
unten C.Krus.



Abb.15
Anti-C.Krus.-Serum
gegen: oben C.Krus.
unten Tor.glab.

Tab.2 Auswertung der Immunelektrophoresepreparate aller in
dieser Arbeit untersuchten Hefen

Antiserum	C.alb.			C.trop.			C.stella.			C.Krus.			Tor.Glab.			Sacch.roux.			Schico.oct.		
Antigen	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka
C.alb.	+++	++	+++	++	+	+++	--	+	---	-	-	+++	-	+	+	-	-	+	-	-	-
C.trop.	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	-	-	+++	-	-	++	-	-	+	-	-	-
C.stella.	+	+	+++	+	++	++	+++	++	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.Krus.	-	-	+	-	+	-	-	-	-	++	++	+++	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Tor.Glab.	-	+	++	-	+	+	-	+	+	-	+	+	++	++	+++	+	+	+	-	-	-
Sacch.roux.	-	-	++	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	++	-	-	-
Schico.oct.	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Cryp.neof.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.utill.	+	-	++	+	+	-	-	+	-	+	-	++	+	-	-	-	-	+	-	-	-
C.curv.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.rob.	+	-	++	-	-	++	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	++	-	-	-
Tor.fam.	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Sacch.cer.	+	-	++	-	-	+	-	-	+	+	-	++	-	+	++	-	-	++	-	-	-

Zeichenerklärung: siehe Tab.1

4. Versuche zur Isolierung von Eiweißantigenen

Falls einige Hefen gemeinsame Polysaccharid- bzw. Glycoproteinantigene besitzen, die sich in der Immunelektrophorese überlagern, kann man durch Kreuzabsorption mit intakten Hefezellen monospezifische Seren gewinnen. Bei Eiweißantigenen ist dies nicht möglich, da sie nach MÜLLER und HIRSCH (1966) nur im Inhalt der Hefezellen vorkommen.

a) Fällung mit Ammoniumsulfat (E₁)

Nach dem Homogenisieren wurden die Zellwände durch Zentrifugieren absedimentiert. Der Überstand wurde mit verschiedenen Mengen gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Das Maximum an Niederschlag ergab sich bei einem Verhältnis von 1 Teil Inhalt zu 2 Teilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung nach 1-2 stündiger Inkubation bei 4° C. Der Niederschlag wurde viermal mit gesättigter (NH₄)₂ SO₄-Lösung gewaschen. Er diente, in 0,9%-iger NaCl-Lösung aufgenommen und mit 0,1 n NaOH auf pH 7 eingestellt, als Antigen sowohl zur Immunisierung als auch für die Immunelektrophorese.

Mit Antiserum gegen *Candida albicans* trat nur eine Linie im Eiweißbereich auf, so daß ein Eiweißantigen rein vorzuliegen schien. Nach Immunisierung stellte sich jedoch heraus, daß diese Substanz noch weitere Antigene enthielt. Das damit gewonnene Antiserum enthielt nicht nur einen gegen das Eiweiß gerichteten Antikörper, sondern auch noch Immunkörper gegen weitere Antigene am Auftragspunkt und im Kathodenbereich. Es wurde deshalb nach einer anderen Methode zur Isolierung von Eiweißantigenen gesucht.

b) Fällung mit dem Universalpuffer nach Britton-
Robinson II (E₂)

Der Universalpuffer nach Britton-Robinson II besteht aus einer Stammlösung (je 0,0286 m Citronensäure, KH_2PO_4 , H_3BO_3 , Veronal und 28,6 ml n/10 HCl in 1000 ml aqua dest.). Um einen pH von 3,9 zu erreichen, werden zu 100 ml Stammlösung 15 ml 0,2 n NaOH hinzugefügt.

Der Zellinhalt wurde mit dem Universalpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt. Mit dem dabei auftretenden Niederschlag und dem Überstand wurden Immunelektrophoresen ange-setzt. Mit dem Niederschlag traten viele Polysaccharid-linien auf. Dagegen zeigte der Überstand, von Spuren im Kathodenbereich abgesehen, mit Anti-Serum gegen Candida albicans eine Eiweißlinie, die der markantesten und am weitesten zur Anode wandernden Albicanslinie entspricht (Abb.16).

Der neutralisierte Überstand diente als Antigen zum Immunisieren. Mit dem so gewonnenen Antiserum (Anti-E₂-Serum) und dem Homogenisat von Candida albicans stellten sich in der Immunelektrophorese zwei Präzipitations-linien im Anodenbereich dar. Außer der am weitesten zur Anode liegenden Bande, die der Reaktion zwischen Überstand und Anti-Serum gegen Candida albicans entsprach (Abb.16), stellte sich eine weitere am Auftragspunkt dar (Abb.17 und 18 oben).



Abb.16 Anti-C.alb.-Serum
gegen Überstand der
Universalpufferfällung

Mit diesem Anti-E₂-Serum und allen in dieser Studie verwendeten Hefearten wurden in einem Arbeitsgang Immun-

elektrophoresen angesetzt. Dabei ergab sich, daß *Candida tropicalis* mit dem Anti- E_2 -Serum nur die am nächsten zum Auftragspunkt gelegene Eiweißlinie bildete (Abb.17 unten); *Candida stellatoidea* zeigte dagegen, wie aus Abb.18 unten hervorgeht, nur die am weitesten zur Anode wandernde Linie. Die anderen Hefearten enthielten weder das eine noch das andere Antigen.

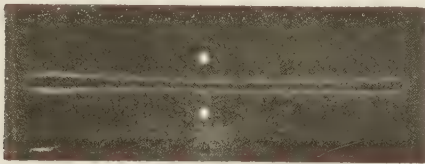


Abb.17 Anti- E_2 -Serum
gegen: oben C.alb.
unten C.trop.



Abb.18 Anti- E_2 -Serum
gegen: oben C.alb.
unten C.stella.

D. BESPRECHUNG

Die Klassifizierung der Hefen wurde und wird von den einzelnen Autoren nach ganz verschiedenen Kriterien vorgenommen. LODDER und KREGER VAN RIJ (1952) teilen sie vorwiegend nach ihrer Fähigkeit zur Askosporenbildung und nach anderen morphologischen Gesichtspunkten ein. KUDRIAZEV (1960) bewertet in seinen Vorschlägen für eine Neueinteilung der Hefen, welcher Stoff von ihnen als Kohlenstoffquelle benutzt wird. Während BARNETT (1961) die biochemischen Leistungen, besonders die Anwesenheit von Enzymen, für wichtige Kriterien hält, bedienen sich SEELIGER (1958) und YUKAWA serologischer Methoden, um die verschiedenen Hefen zu differenzieren. TSUCHIYA (1965) berücksichtigt in dem von ihm vorgeschlagenen Klassifikationsschema serologische, biochemische, morphologische und phylogenetische Gesichtspunkte, soweit sie mit den von ihm und seinen Mitarbeitern ausgearbeiteten Antigenanalysen übereinstimmen. Die Eiweißantigene bleiben in diesen Analysen allerdings unberücksichtigt. BIGUET (1961), der als erster auf die Eiweiße in den Hefezellen aufmerksam machte, benutzte für seine Untersuchungen die Immunelektrophorese.

Um gute Präzipitationslinien in der Immunelektrophorese zu erhalten, benötigt man konzentrierte Antigene und Antiseren von optimalem Antikörpergehalt. Wie SEELIGER (1962) und BIGUET (1962) u.a. beschreiben, reagieren nicht alle Tiere auf das gleiche Antigen mit der Bildung von Antikörpern. So erhielten wir beispielsweise mit *Saccharomyces rouxii* nur bei einem von mehreren Tieren Antikörper gegen Eiweißantigene. Auch die nur einseitig mit dem Antiserum gegen *Saccharomyces rouxii* nachgewiesene Antigengemeinschaft zwischen *Saccharomyces rouxii* und *Schiosaccharomyces octosporus* zeigt ebenso, wie die negative Immunisierung mit *Cryptococcus neoformans*, daß eine gewisse Fehlerbreite berücksichtigt werden muß.

Ferner müssen Antigen- und Antikörpermenge in einem bestimmten Verhältnis zueinander vorliegen. Sind Antigene oder Antikörper in zu großem Überschuß vorhanden, können sich einige Präzipitationslinien auflösen. Diese Banden kann man fixieren, wenn man die Diffusionszeit unterbricht, sobald sie gerade sichtbar geworden sind. Kennt man diese methodischen Fehlerquellen, so lassen sich Trugschlüsse weitgehend vermeiden und reproduzierbare Ergebnisse gewährleisten.

TSUCHIYA (1965), der das umfassendste Antigen-schema aufgestellt hat, reiht *Candida curvata* und *Cryptococcus neoformans* in das Genus *Cryptococcus* ein. Er beschreibt, daß *Cryptococcus neoformans* mit *Candida albicans* 2-3 Antigene gemeinsam hat, mit *Candida curvata* aber nur eines: Wir kamen auf Grund der Immunelektrophorese ebenfalls zu dem Ergebnis, daß *Candida curvata* mit *Cryptococcus neoformans* näher verwandt ist als mit sämtlichen *Candida*-arten. Aus Tab.2 ist ersichtlich, daß *Candida curvata* keine Präzipitationslinien mit anderen *Candida*-hefen bildet, während *Cryptococcus neoformans* nur mit *Candida albicans* und *Candida Krusei* gemeinsame Polysaccharidlinien zeigt (Abb.7 und 12). *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida robusta* finden sich bei TSUCHIYA (1965) in seiner "Group II", wobei *Candida robusta* und *Saccharomyces cerevisiae* in der Antigenformel nahezu identisch sind. Wir konnten ebenfalls feststellen, daß *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida robusta* mit allen in dieser Arbeit verwendeten Seren übereinstimmend reagieren. Mit Anti-Serum gegen *Saccharomyces rouxii* haben wir bei beiden Stämmen den gleichen typischen Bogenverlauf erhalten, so daß kein Unterschied zwischen ihnen feststellbar ist (Abb.10 und 11). In diesen Punkten stimmen wir mit TSUCHIYA (1965) völlig überein.

Andere Ergebnisse erhielten wir jedoch in Bezug auf die Antigenverwandtschaft zwischen *Torulopsis glabrata* und den

Candidaarten. TSUCUIYA (1965) stellt *Torulopsis glabrata* mit *Candida albicans*, *tropicalis* und *stellatoidea* in einer Gruppe zusammen, schließt aber *Candida Krusei* aus. Wir konnten feststellen, daß *Torulopsis glabrata* mit *Candida albicans*, *tropicalis* und *stellatoidea* gemeinsame Polysaccharidlinien bildet, *Candida Krusei* weist dagegen mit *Torulopsis glabrata* die meisten Antigengemeinschaften auf, nämlich neben Polysaccharid- auch Eiweißantigene. HASENCLEVER und MITCHELL beschreiben auch die Verwandtschaft von *Torulopsis glabrata* mit *Candida albicans*, *tropicalis* und *Krusei*, wobei *Candida tropicalis* mit *Torulopsis glabrata* am engsten verwandt sein soll.

Abweichend von TSUCHIYA (1965) scheint uns aber *Saccharomyces rouxii* mit *Torulopsis glabrata* nahe verwandt zu sein (Abb.4 und 5). TSUCHIYA (1965) reiht jedoch beide in verschiedene Gruppen ein; ebenso verfährt er mit *Torulopsis famata* und *Candida utilis*, die beide mit Anti-Serum gegen *Torulopsis glabrata* eine gemeinsame Eiweißlinie zeigen und mit den anderen Seren übereinstimmende Bögen im Polysaccharidbereich bilden. Auch diese Gemeinsamkeiten hat TSUCHIYA (1965) nicht erkannt, weil er mit seiner Methode die Eiweißantigene nicht erfasst.

Für diese Ergebnisse gilt insofern eine gewisse Fehlerbreite, als man letztlich nicht mit Sicherheit sagen kann, ob wirklich alle Antigene erfaßt werden. Wir sehen es deshalb als Voraussetzung für die Aufstellung von Antigen-schemata an, daß einzelne Antigene isoliert werden, um damit monospezifische Seren herzustellen. Wir machten die Erfahrung, daß Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene Antikörper schneller und besser induzieren, da sie wegen ihrer Menge und Ladung aber nicht so differenziert wandern, legten wir besonderes Gewicht auf die Isolierung der Eiweißantigene.

Mit der Ammoniumsulfatfällung vom Zellinhalt gelang es nicht, monospezifische Seren beim Tier zu induzieren,

obwohl es zunächst so auszusehen schien.

Nach Immunisieren mit dem Überstand der Universalpufferfällung wurde ein Immun-Serum gewonnen, das Antikörper gegen zwei Antigene enthielt. Der eine davon bildete mit dem entsprechenden *Candida albicans*-Antigen eine ausgeprägte, sehr weit anodenwärts wandernde Bande und eine zartere, näher dem Auftragspunkt liegende Linie. Mit diesem Serum konnte festgestellt werden, daß unter allen in dieser Arbeit untersuchten Hefen nur *Candida tropicalis* ein Antigen mit *Candida albicans* gemeinsam hat. Es führt in der Immunelektrophorese zu einer Präzipitationslinie am Auftragspunkt. Das Eiweißantigen, das am weitesten anodenwärts wandert, findet man außer bei *Candida albicans* nur noch bei *Candida stellatoidea*. MÜLLER und BÜRGER (1965) berichteten bereits, daß sie die drei nahe verwandten Hefen *Candida albicans*, *tropicalis* und *stellatoidea* deutlicher in den Eiweißantigenen unterscheiden als in den Polysaccharidantigenen.

Für eine serologische Diagnostik der Hefen im Sinne der Gruber'schen Objektträgeragglutination haben die Eiweißantigene und die gegen sie gerichteten Antikörper keine Bedeutung. Ihre Berücksichtigung scheint uns aber für die Aufstellung von Antigenschemata und für die Antigenidentifizierung unerlässlich.

E. ZUSAMMENFASSUNG

An einer willkürlichen Auswahl von Stämmen aus den Spezies *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Schicosaccharomyces*, *Cryptococcus* und *Candida* konnten mit Hilfe der Immun-elektrophorese zahlreiche antigene Beziehungen auf Grund gemeinsamer Eiweiß- oder Polysaccharidlinien nachgewiesen werden.

Wie TSUCHIYA (1965) konnten auch wir nahe Antigen-gemeinschaften von *Candida curvata* mit *Cryptococcus neoformans*, von *Candida robusta* mit *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces rouxii*, sowie von *Torulopsis glabrata* mit *Candida albicans*, *tropicalis* und *stellatoidea* feststellen.

Wir fanden zusätzlich, besonders unter Berücksichtigung der Eiweißantigene, noch Verwandtschaften zwischen *Torulopsis glabrata* mit *Saccharomyces rouxii* einerseits, sowie von *Candida Krusei* mit *Torulopsis glabrata* andererseits. Eine Antigengemeinschaft konnte auch zwischen *Torulopsis famata* und *Candida utilis* festgestellt werden.

Um nähere Angaben über die Eiweißantigene von *Candida albicans* machen zu können, wurde versucht, sie durch Herausfällen anderer Substanzen mit Hilfe eines Universalpuffers zu isolieren. Mit dem Überstand dieser Fällung erhielten wir nach Immunisieren ein Serum, das Antikörper gegen zwei Antigene aufwies, von dem das eine nur bei *Candida tropicalis*, das andere nur bei *Candida stellatoidea* vorkommt, aber bei keine der anderen untersuchten Hefen. Diese Beobachtung ist ein weiterer Beweis, daß die Eiweißantigene zur Differenzierung der Hefen sehr wichtig sind.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Barnett, J.A.:

Biochemical classification of Yeasts

Nature 189 (1961) 76

Benham, Rh.W.:

Certain Monilias parasitic on man

J.Infect. Dis. 49 (1931) 183-215

Biguet, J., Havez, R., Tran van Ky, D. et Degaey, R.:

Etude électrophorétique, chromatographique et immunologique des antigenes de Candida albicans-
Caracterisation de deux antigènes spécifiques.

Ann. Inst. Pasteur 100 (1961) 13-24

Biguet, J., Tran van Ky, D. et Andrieu, S.:

Etude électrophoretique et immunochimique comparée des antigènes de quelques levures du genre Candida.

Mycopathologia 17 (1962) 239-254

Evans, E.E., Sorensen, L.J. and Walls, K.W.:

zit. nach Seeliger, H.P.R.

Grabar, P. et Williams, C.A.:

Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques

Biochim. biophysica acta 17 (1955) 64-74

Hasenclever, H. and Mitchell, W.O.:

Antigenic relationship of Torulopsis glabrata and seven Species of the Genus Candida

J.Bact. 79 (1960) 677

Kudriazev, W.:

Die Systematik der Hefen. (Deutsche Übersetzg. aus dem Russ. von R. Wittwer) Hrsg. von R. Dick-scheit, Akademie Verlag Berlin (Ost) 1960

Lodder, J. and Kreger van Rij, N.J.W.:

The Yeasts

North Holland Publ. Co Amsterdam (1952)

Müller, H.L. und Bürger, H.:

Antigenanalyse von *Candida albicans* und *C.tropicalis*

Zbl. Bakt. I Orig. 198 (1965) 240-242

Müller, H.L. und Hirsch, M.:

Zur Antigenstruktur von *C.albicans* und *C.tropicalis*

Zbl. Bakt. I Orig. (im Druck)

4.Mitteilung: Immun-elektrophoretische Antigenstudien an Zellmembran und Zellinhalt.

Müller, H.L., Siegert, R. und Pachaly, D.:

Zur Antigenstruktur von *C.albicans* und *C.tropicalis*

2.Mitteilung: Serologisches Verhalten von Zellmembran und Zellinhalt nach Phenol/Wasserextraktion.

Zbl. Bakt. I Orig. 193 (1964) 117-122

Negróni, P. und Lamata, C.A.:

Zit. nach Seeliger, H.P.R.

Seeliger, H.P.R.:

Mykologische Serodiagnostik

Johann-Ambrosius-Barth-Verlag, Leipzig 1958

Seeliger, H.P.R.:

Serodiagnostik der Pilze

Zbl. Bakt. I Orig. 184 (1962) 211-213

Scheidegger, J.J.:

Une micro-méthode de l'immunoélectrophorese

Intern. Arch. Allergy 7 (1955) 103-110

Tsuchiya, T., Fukzawa, Y. and Kawakita, S.:

Significance of serologic studies on Yeasts

Mycopath.et mycol.appl. 26 (1965) 1-15

Yukawa

Zit. nach Tsuchiya

Lebenslauf

Am 4. Februar 1940 wurde ich, Karin, Elisabeth, Gerda Arndt als viertes Kind des Studienrates Ernst Arndt und seiner Ehefrau Irma, geb. Reitz, in Arnswalde/Pommern geboren. Die Reifeprüfung legte ich am 19. Februar 1959 an der Auguste-Viktoria-Schule in Flensburg ab. Im Sommersemester 1959 begann ich das Zahnmedizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel, wo ich am 28. Oktober 1961 das Physikum bestand. Vom Wintersemester 61/62 an setzte ich den klinischen Teil des Studiums an der Universität Marburg fort und bestand am 24. August 1964 das Staatsexamen. Seit Juli 1965 bin ich mit dem Zahnarzt Wilfried Kranenberg verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Kiel die Herren Professoren und Dozenten
Bargmann, Grewe, Horstmann, Kleinfeller, Kneese, Juza,
Lochte-Holtgreven, Lullies, Netter, Schiebler, Siewing,
Uhlig.

in Marburg die Herren Professoren und Dozenten
Braun-Falco, Gedigk, Hartmann, Hennis, Hering, Heuser,
Hornung, Janke, Korb, Kottmeyer, Lang, Löhr, Marx, Maurath,
Meyer, Pantke, Schiff, Schmid, Siebert, Siess.

Herrn Professor Dr.med. R.Siegert, Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Marburg an der Lahn, danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für die uneingeschränkte Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Besonderen Dank sage ich Frau Dr.med. H.-L.Müller für ihre ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Beratung bei der Durchführung der Versuche.

